

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-245702

(43)Date of publication of application : 24.09.1996

(51)Int.Cl. C08B 37/00
// C12P 19/04

(21)Application number : 07-052964 (71)Applicant : MIZUNO DENICHI
SOMA GENICHIRO
(22)Date of filing : 13.03.1995 (72)Inventor : MIZUNO DENICHI
SOMA GENICHIRO
NISHIZAWA TAKASHI

(54) HIGH-MOLECULAR WEIGHT LIPOPOLYSACCHARIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new high-molecular weight lipopolysaccharide(LPS) high in safety and biological activity, thus usable as a medicine, etc.

CONSTITUTION: This new high-molecular weight LPS is obtained from a specific kind of microbes and has the following physicochemical properties: (a) molecular weight determined by SDS-PAGE method using a protein marker is 30000-60000, and does not virtually contain fractions having ≤ 10000 molecular weight; (b) hexosamine content determined by Elson-Morgan method is 3-9/molecular weight of 30000; and (c) 2-keto-3-deoxyoctonate content determined by diphenylamine method is 20-30/molecular weight of 30000.

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Molecular weights which it was obtained from a microbial cell and measured by the SDS-PAGE method using the following physicochemical property of a-c and a protein marker are 30,000-60,000, Hexosamine contents measured by the b Elson Morgan method are [that a with a molecular weight of 10,000 or less fraction is not included substantially,] 3-9 pieces / molecular weight 30,000, And the amount lipopolysaccharide of polymers which has that 2-****- 3-deoxy oct NETO contents measured with c diphenylamine method are 20-30 pieces / molecular weight 30,000.

[Claim 2] The amount lipopolysaccharide of polymers according to claim 1 whose microorganism is a gram-negative microorganism.

[Claim 3] The amount lipopolysaccharide of polymers according to claim 1 or 2 whose microorganism is a microorganism belonging to a punt exhaust air (Pantoea) group.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the new amount lipopolysaccharide of polymers which shows high bioactive and safety and has a specific physicochemical property. This invention relates, for example to the remarkable and improved amount lipopolysaccharide of polymers useful to drug development, such as an immune-function activator, in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] Lipopolysaccharide (lipopolysaccharide.) indicating it as LPS below -- it is -- it is a conjugated compound which consists of the lipid and sugar which exist in the adventitia surrounding the peptidoglycan of Gram-negative-bacterium cell walls, such as Escherichia coli, a salmonella, and Bordetella pertussis. The volume [Jay em GYUSEN and on Earl Hacken Bec (J. M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) which are known as an active ingredient of an O antigen and endotoxin, "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, bacterial cell wall (Bacterial Cell Wall), the 18th page, and ERUSE veer (Elsevea). A shrine, 1994].

The basic structure of LPS consists of three ingredients, the lipid A which has unique lipid, the oligosaccharide called R core which carried out the covalent bond to it, and also O unique polysaccharide, (the volume on Nikkei biotech, the "Nikkei biotechnology newest glossary", the 431st page, Nikkei McGraw-Hill, Inc., 1985).

[0003] The basic structure of lipid A is common to many strains, and the basic skeleton consisted of guru KOSAMINIRU glucosamine of beta-1 and 6 combination, and has combined phosphoric acid at least with the C-1st place and C-4 ' in many cases, respectively. Although each amino group combines 3-hydroxyfatty acid, a hydroxyl group combines several sorts of saturated fatty acid, or hydroxyfatty acid and the peculiar glycolipid is formed, the kind of fatty acid changes somewhat with strains. Although it is an example of a small number of, basic skeletons completely differ, and the example which consists only of the 2,3-diamino- 2 and 3-dideoxy D-glucose is also reported (the volume on Noma ****, "the 49th volume of a medical department study great dictionary", the 82nd page, Kodansha, 1984).

[0004]When the structure of R core is common to the strain of most which belongs to it like Salmonella, The volume [Jay em GYUSEN and on Earl Hacken Bec (J. M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) by which several sorts of selectively different structures like Escherichia coli may be known, "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, bacterial cell wall (Bacterial Cell Wall), the 283rd page, and ERUSE veer (Elsevea) A shrine, 1994]. Although heptose and 2-****- 3-deoxy oct NETO (it may be indicated as the following KDO) are constituents common to many R cores and have generally combined with lipid A via KDO, The volume [Jay em GYUSEN and on Earl Hacken Bec (J. M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) by which existence of LPS which lacks either or both sides by the strain is also known, "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, bacterial cell wall (Bacterial Cell Wall), the 294-295th page, and ERUSE veer (Elsevea) A shrine, 1994].

[0005]The structure of O unique polysaccharide is the most various in a constituent, is specific to a strain, and shows the activity as what is called an O antigen. Although characterized by the repetitive construct of the oligosaccharide which generally consists of several sorts of monosaccharides, the thing which consists of the same monosaccharide, or the thing which is not a repetitive construct is also known. The biosynthesis of O unique polysaccharide has received rule of a different gene from it of R core, It is possible to replace O unique polysaccharide of the strain which changes with junction or transduction, The volume [Jay em GYUSEN and on Earl Hacken Bec (J. M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) which are applied to the toxicity of a bacillus, research of the vaccine, etc., "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, bacterial cell wall (Bacterial Cell Wall), the 265-267th page, and ERUSE veer (Elsevea) A shrine, 1994].

[0006]Although LPS has very various pharmacological actions, For example, when an antigen and LPS are simultaneously prescribed for the patient, since immunoreaction is enhanced, LPS is applied as a kind of the adjuvant (adjuvant) which heightens a vaccine effect now (editing besides Son Homma, "bacterial endotoxin", the 312nd page, Kodansha, 1973). although it is reported that the molecular weights of LPS are various with millions to thousands according to the association condition (the volume on Homma ****.) As LPS whose molecular weight is 30,000 to about 60,000 in "bacterial endotoxin", the 217-218th page, Kodansha, and 1973, Escherichia coli origin LPS of the molecular weight 30,000**5,000, the number **6 45/of molecular weights 30,000 of hexosamines, and the KDO number 5-***1/molecular weight 30,000 (JP,H4-49245,A), Escherichia coli origin LPS (JP,H6-40937,A) of the molecular weight 40,000**10,000, the number **6 45/of molecular weights 30,000 of hexosamines, and the KDO number 5-***1/molecular weight 30,000, etc. are reported until now.

[0007]About the use of LPS, by the inventor of this invention, etc. until now An anti-toxoplasma agent (JP,H4-492459,A), A cholesterol lowering agent (JP,H4-49243,A), an anti-herpes agent (JP,H4-49242,A), An anti-rheumatism agent (JP,H4-49241,A), antidiabetic (JP,H4-49244,A), an anti-peptic ulcer agent (JP,H4-49240,A) and an immune-function activator (JP,H4-99481,A.) JP,H6-141849,A, taking orally and an endermic immune-function accelerator (JP,H4-187640,A), the painkiller (JP,H6-40937,A), the growth accelerator (JP,H3-155778,A), the anti-withdrawal symptom agent (JP,H6-65092,A), etc. are proposed.

[0008]However, LPS usually obtained from a microorganism, For a meeting, chemically by unevenness (mixture of various LPS in which a molecular weight differs from chemical composition). It was very difficult to specify the description physicochemically, and toxicity was also high, and there was a limit in application as drugs (edited by Japan Tissue Culture Association, the "cell growth factor partII", the 121st page, Asakura Publishing, 1987).

[0009]Although the inventor of this invention was indicating existence of with a molecular weight of about 30,000 to 60,000 LPS (JP,H4-99481,A), this is a mixture with with a molecular weight of about 5,000 to 6,000 LPS, and contained the considerable amount of the fraction of low molecular weight.

[0010]

[Problem to be solved by the invention]As aforementioned, LPS of the amount of polymers reported conventionally is an uneven mixture containing low-molecular-weight LPS, for example, in order to use clinically as drugs ingredients, such as an immune-function activator, satisfaction is necessarily impossible also from the field of safety, or the field of drug effect performance.

[0011]For this reason, conventional technology was improved, amount LPS of polymers refined highly was separated, and it looked forward to examining that industrial usefulness. This invention is made in view of the situation as above, safety is high (namely, low [toxicity]), and bioactive is excellent and an object of invention is to provide new

amount LPS of polymers specified chemically.

[0012]

[Means for solving problem]The result of having inquired wholeheartedly in order that the inventor of this invention might solve aforementioned SUBJECT, LPS to amount LPS of polymers which is reported conventionally and which is specified physicochemically was refined, and moreover, compared with conventional LPS, this new amount LPS of polymers found out that bioactive was also excellent highly [safety] as compared with conventional LPS, and completed this invention extremely.

[0013]This invention is obtained from a microbial cell and Namely, the following physicochemical property of a·c, a) The molecular weights measured by the SDS-PAGE method using the protein marker are 30,000-60,000, and a with a molecular weight of 10,000 or less fraction is not included substantially, b) The hexosamine contents measured by the Elson Morgan method are 3-9 pieces / molecular weight 30,000, And the amount lipopolysaccharide of polymers which has that the 2-****- 3-deoxy oct NETO contents measured with c diphenylamine method are 20-30 pieces / molecular weight 30,000 is provided.

[0014]In this invention, it requires also as a desirable mode that the aforementioned microorganism is Gram negative bacterium and that that Gram negative bacterium is a microorganism belonging to a punt exhaust air group further. Hereafter, this invention is explained in detail. In the following explanation, the display of percentage is a value by weight, as long as there is no notice especially.

[0015]Amount LPS of polymers of this invention a gram-negative microorganism, for example, the microorganism belonging to a punt exhaust air group, etc., A method publicly known from a biomass of having cultivated with the conventional method, and having collected and collected biomasses from the culture medium, For example, heat phenol process [Ore Westphal (O. Westphal) editing, The MESOZZU yne carbo hydrate chemistry (Methods in CarbohydrateChemistry), The 5th volume, the 83rd page, Academic Press (Academic Press), and 1965] extract, and anion exchange resin refines further and it can manufacture. Namely, suspend the biomass of a microorganism to distilled water, and this suspension is added and agitated into the mixed liquor of distilled water and heat phenol of the amount of isochore, Subsequently, centrifuge, collect water layers, dialyze this water layer, and phenol is removed, It condenses by the extra **** method, a rough LPS fraction is extracted, the anion exchange chromatography (for example, mono- Q-sepharose or Q-sepharose is used) of a conventional method refines this fraction, and it desalts with a conventional method.

[0016]Thus, by carrying out gel **** of obtained refining LPS, for example under existence of surface-active agents, such as a sodium deoxycholate, Only fractions containing amount LPS of polymers can be collected, intermingled low-molecular-weight LPS can be removed, and new amount LPS of polymers of this invention refined highly can be obtained. Amount LPS of polymers of this invention manufactured by the above method, Molecular weights measured by the SDS-PAGE method using a protein marker are 30,000-60,000, and a with a molecular weight of 10,000 or less fraction is not substantially included as shown in the example 1 of an examination which carries out a postscript, b) Hexosamine contents measured by the Elson Morgan method are 3-9 pieces / molecular weight 30,000, And it has the physicochemical property that 2-****- 3-deoxy oct NETO contents measured with c diphenylamine method are 20-30 pieces / molecular weight 30,000.

[0017]New amount LPS of polymers of this invention can also be used together with a substance which can also use it as drugs which have an immune-function activation operation, a medicine for animals, etc., and has other publicly known immune-function activation operations. Next, an example of an examination is shown and it explains in more detail about amount LPS of polymers of this invention.

the example 1 of an examination -- amount LPS of polymers of this invention of this examination is physicochemical, and it investigates biological character -- it carried out for accumulating.

1) Amount LPS of polymers and conventional LPS were prepared, respectively by the same method as the preparation embodiments 1 of a sample, and the reference example 1.

2) Amount LPS of measurement polymers and conventional LPS (it is only indicated as LPS below) of the test-method ** molecular weight were respectively dissolved in distilled water, the solution with a concentration of 2mg/ml was prepared, and the 10microg was scaled to the 1.5-ml ** plastic tube. Apart from this, 10%(w/v) SDS of 180microl, the 5%beta-mercaptoethanol of 45microl, It added to said each sample solution, and mixed enough, and subsequently to under the boiling water bath during 5 minutes SDS processing fluid 10mul which added the CBB coloring matter

solution of 90microl, the 0.5M trischloride (pH 6.8) of 112.5microl, and the distilled water of 22.5microl, and was prepared was dipped, and was promptly dipped and quenched in ice water after that.

[0018]The migration buffer solution which dissolved in 1 l. of distilled water, and prepared 10-ml 10%(w/v) SDS, 17.9 g of fricin, and 3.03 g of tris was put into the slab-gel-electrophoresis tub (made in Mari Sol). Polyacrylamide gel was fixed to the migration tub 20%, the sample was put into the sample slot, and migration was continued until it fixed to 150V and the pigment eluted voltage from gel after [for 1 hour] 50V. After the end of migration, the argentation kit 161-0443 (made by Bio-Rad) performed the argentation at the room temperature, and the action was checked.

** the fixed-quantity hexosamine content of hexosamine content -- Elson Morgan (Elson-Morgan) -- it quantified as follows by law (edited by Japanese Biochemical Society, a "biochemistry experiment lecture", the 4th volume, the 377-379th page, the 1st edition, the Tokyo Kagaku Dojin publication, 1976). Dissolve LPS in distilled water, prepare a solution with a concentration of 2mg/ml, and the 100microl is scaled to a spitz with a screw cap (made by an Iwaki glass company), 8NHCl of 100microl was added to this, it heated at 110 ** for 16 hours, about 200microl addition of after 4NNaOH was done, and pH was adjusted to seven. The 100microl was scaled, it put into another spitz with a screw cap, the reagent A of 200microl was added, and it heated at 105 ** for 1.5 hours, and cooled with the stream. Subsequently, the 100microl was isolated preparatively, the 96% ethanol of 670microl was added, the reagent B of 67 moremicrol was added, it allowed to stand at the room temperature for 1 hour, and the absorbance at 535 nm was measured. As a standard sample for analytical curve creation, 0-800 microg/ml N-acetyl glucosamine (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) was used.

Mixed liquor of the acetylacetone of A:75micro of reagents 1, and 2.5 ml of 1.25N sodium carbonate.

Mixed liquor of p-dimethylbenzaldehyde of B:1.6 g of reagents, 30 ml of concentrated hydrochloric acid, and 30 ml of 96% ethanol.

** The fixed-quantity KDO content of the KDO content was quantified as follows with the diphenylamine method [Analytical Biochemistry (Analytical Biochemistry), the 58th volume, No. 1, 123-129th page, and 1974].

[0019]500 mg of diphenylamine (made by Wako Pure Chem), 5 ml of ethanol (made by Wako Pure Chem), 45 ml of glacial acetic acid (made by Wako Pure Chem), and 50 ml of concentrated hydrochloric acid (made by Wako Pure Chem) were mixed, and the KDO detecting reagent was prepared. The solution of 250microl which includes each sample in the 500microl by the concentration of 0.50mg/ml is mixed, and it heats for 30 minutes in a 100 ** boiling water bath, cools for 30 minutes in after constant temperature water (24-25 **), and is a spectrophotometer (made by Hitachi.). The absorbance in 420, 470, and 630 or 650 nm was measured with the model U2010 (measured value is respectively indicated to be A420, A470, A630, and A650). As a standard sample, KDO ammonium salt (made by sigma company) solution 250mul of the concentration of a 0.5micro mol was used.

[0020]From four sorts of measured value of the sample sample and the standard sample, S value was calculated by the formula (1) and the S value of the sample sample and the standard sample was made into S_t and S_s , respectively. Subsequently, X mols of KDO were computed by the formula (2).

$S=A420 \cdot A470 + A630 \cdot A650$ (1)

$X=(\text{molecular weight of 1 mol of } 0.5 \times S_s \times \text{LPS}) / (0.5 \times S_t \times 10^6) - \dots\dots\dots(2)$

** the rim lath test (the volume for Ikuo Suzuki.) whose measurement rim lath activity of rim lath activity is the endotoxin assay using the king crab corpuscle extract and coloring synthetic substrate which were originated by Levin in 1968 The 14th volume of development of "drugs: It means presenting a positivity in the quality control of drugs and examining method", the 227-243rd page, Hirokawa Publishing, and 1990, and this rim lath test is known as LPS detection system. as a reference standard -- the E Coli (E. coli) of 345 pg/EU -- it measured using the TOKISHI color system (made by Seikagaku) using 0111:B4.

3) The result of the test-result ** molecular weight determination of molecular weight is as being shown in drawing 1. Protein and amount marker of peptide molecules [94kD to which drawing 1 is an SDS-PAGE migration figure, and migration of the lane 1 in a figure was carried out simultaneously, 67kD, 43kD, 30kD, 20.1kD, 17.2kD, 14.6kD, 14.4kD, 8.24kD, 6.38kD, 2.56kD(Pharmacia manufacture)], The lanes 2, 3, and 4 are LPS (20microg, 5microg, and 1.25microg), the lanes 5, 6, and 7 are amount LPS of polymers (20microg, 5microg, and 1.25microgmug), and the vertical axis of a figure shows a molecular weight.

[0021]The molecular weight of amount LPS of polymers was 60kDa from 30kDa like drawing 1. On the lane 5, in spite of having carried out migration of amount LPS of polymers of 20microg, low-molecular-weight LPS was not

accepted at all. From the above result, the molecular weights of amount LPS of polymers of this invention are 30,000-60,000, and it became clear that low-molecular-weight LPS was removed thoroughly. ** The number of hexosamines of amount LPS of polymers of invention of hexosamine ***** was the 6.18-/molecular weight 30,000. ** KDO contained in amount LPS of polymers of invention of KDO ***** was the 25.38-/molecular weight 30,000. ** The rim lath activity of amount LPS of polymers of invention of rim lath ***** was 1.45 EU/ng.

[0022]Although the kind of microorganism and the manufacturing method of the sample were changed and examined, the almost same result was obtained.

the example 2 of an examination -- this examination investigates the acute toxicity of amount LPS of polymers of this invention -- it carried out for accumulating.

(1) The toxicity of LPS prepared by the same method as amount LPS of polymers and the reference example 1 which were prepared by the same method as preparation and the test-method embodiment 1 of a sample was examined using the 7-week old C3 H/helium mouse (from the Japanese Charles libber company to purchase). Each sample was dissolved in the physiological saline and a medicine was prescribed for the patient into the vein at a rate of per [5.0 and 10] animal or 20 mg/kg at the mouse group which consists of one groups [four]. The life and death of the mouse were observed for after-administration 72 hours.

(2) an examination result -- the result of this examination is as being shown in Table 1. In intravenous administration, in amount LPS of polymers of this invention, three mice died from 20 mg/kg administration among four animals, and LD₅₀ was 18 mg/kg so that clearly from Table 1, but. In LPS, total died from the dose of 10 and 20 mg/kg, and LD₅₀ was 6.0 - 8.6 mg/kg. Although the kind of microorganism and the manufacturing method of the sample were changed and examined, the almost same result was obtained.

[0023]

[Table 1]

試 料	静 脈 内 投 与			
	投 与 量 (mg/kg)	死亡数	死 亡 率 (%)	LD 50
L P S	5 10 20	0/4 4/4 4/4	0 100 100	7.1 (6.0-8.6)
高分子量 L P S	5 10 20	0/4 0/4 3/4	0 0 75	18 (13-24)

[0024]the example 3 of an examination -- this examination investigates the toxicity at the time of carrying out intracutaneous administration of amount LPS of polymers of this invention -- it carried out for accumulating.

(1) The same amounts LPS and LPS of polymers as preparation of a sample and the example 2 of a test-method examination were examined by the same method as the example 2 of an examination except for having prescribed a medicine for the patient into the abdomen hide by the dosage of per [10, 20, and 40] animal or 80 mg/kg.

(2) an examination result -- the result of this examination is as being shown in Table 2. 40 and when 80 mg/kg administration was carried out, four animals died LPS among four animals in each case, so that clearly from Table 2. On the other hand, in amount LPS of polymers, the example of death is 0 and three animals died from the dose of 40 mg/kg among four animals with the dose of 80 mg/kg.

[0025]When LD₅₀ is computed from the result of the example 2 of a pre-examination, and the example 3 of an examination, it is as in Table 3. Compared with it of LPS, it was about 2.5 times the value of LD₅₀ of amount LPS of polymers of this also in any of intravenous administration and intracutaneous administration so that clearly from Table 3. These results showed that a difference of the molecular weight of LPS affected toxicity, amount LPS of polymers was compared with conventional LPS, and, the inside of a vein, and in the case of which [of intracutaneous administration], the toxic low thing became clear extremely. Although the kind of microorganism and the manufacturing method of the sample were changed and examined, the almost same result was obtained.

[0026]

[Table 2]

試料	皮内投与			
	投与量 (mg/kg)	死亡数	死亡率 (%)	LD 50
L P S	10	0/4	0	28 (23-34)
	20	0/4	0	
	40	4/4	100	
	80	4/4	100	
高分子量 L P S	10	0/4	0	72 (52-98)
	20	0/4	0	
	40	0/4	0	
	80	3/4	75	

[0027]

[Table 3]

試料	毒性 (LD 50) (mg/kg)	
	静脈内投与	皮内投与
L P S	7.1 (6.8-8.6) 7.0 (2.5-20)	28 (23-34)
高分子量 L P S	18 (13-24)	72 (52-98)

[0028]the example 4 of an examination -- the TNF production ability which has antitumor action for the bioactive of amount LPS of polymers of this invention was investigated as an index.

1) The TNF sexuparous effect was examined by abdomen intracutaneous administration using the sample offering animal and the 7-week old male C3 H/helium mouse (it purchases from Charles River Japan, Inc.) of test method each three groups as follows.

[0029]1, 10, or 0.05 ml of 100micro g physiological salines that are included were injected in the abdomen hide of each mouse, LPS obtained by the same method as amount LPS of polymers or the reference example 1 manufactured by the same method as Embodiment 1 was collected blood 1.5 hours afterward, and the blood serum was separated with the conventional method. The TNF activity in each obtained blood serum was measured by the method of being based on the toxicity over L929 cell, as follows. that is, L929 cell was prepared to the concentration of an 8×10^4 individual / 100microl by the MEM culture medium which contains fetal calf serum 5%, this was wound around each hole of 96 hole flat bottom plate 100microl every, and it cultivated under 2 hours and 5%CO₂ existence at 37 **. Actinomycin-D was added at a 1 microg/ml rate after that, the serum sample or positive control Homo sapiens TNF-alpha (made by Asahi Chemical Co., Ltd.) which carried out stage dilution by the MEM culture medium was added every [50micro / l], and it cultivated on the same conditions further for 18 hours. The aspirator removed the culture medium, it washed by 37 ** PBS, the dead cell was removed thoroughly, the 1% methyl alcohol solution which contains Crystal Violet 0.1% was added, and the viable cell was dyed. TNF activity was calculated based on the relation between the dilution ratio of TNF-alpha which measured the absorbance in OD (590 nm) as an index, and used this degree of dyeing as positive control, and an absorbance.

2) an examination result -- this result is as being shown in Table 4. In Table 4, TNF activity is the average value of each three groups. Having been twice [about] was admitted as compared with LPS by which the TNF production effect of amount LPS of polymers of this invention is acquired from this result by the method of the reference example 1. Although the kind of microorganism and the manufacturing method of the sample were changed and examined, the almost same result was obtained.

[0030]

[Table 4]

試 料	投与量	血清中TNF濃度 (単位／ml)
	(μ g/匹)	皮 内 投 与
L P S	1. 0	4. 0
	1 0	1 3. 1
	1 0 0	2 5. 5
高分子量 L P S	1. 0	7. 7
	1 0	2 4. 3
	1 0 0	5 4. 2

[0031]10 g of reference example 1 trypton (made by Difco), 5 g of yeast extracts (made by Difco), NaCl (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) Glucose which added 10 g of bests to 1 l. of distilled water, adjusted pH to 7.5 by NaOH, sterilized with autoclave, and sterilized independently (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) To the Sakaguchi flask of 500-ml ** of 100 ml of culture media (it is indicated as L-bouillon culture medium below) added at a rate of 0.1% which entered, a best. Punt exhaust air AGUROME lance (Pantoea agglomerans) saved at 80 ** A single colony is separated and inoculated from a preservation strain, Shaking culture was carried out at 35 ** 1 night, and as it was, the whole quantity was inoculated into the Sakaguchi flask of 3 liter capacity containing 1,000-ml L-bouillon culture medium, and was cultivated in a similar manner.

[0032]The biomass cultivated to the table-top-type fermentor (made by B.E. MARUBISHI Co., Ltd.) of 10 liter capacity containing 7-l. L-bouillon culture medium was inoculated, on the conditions, aeration culture was carried out, the after harvest was carried out, about 70-g wet fungus bodies were collected, and cryopreservation of this was carried out. 500 ml of 90% heat phenol was added, and at 65-70 **, it agitated for 20 minutes, and cooled [about 70 g of cryopreservation biomasses were suspended to 500 ml of distilled water, and], at long-intervals heart processing was carried out at 10,000G and 4 ** for 20 minutes, and water layers were collected. 2 times of the water layers which repeated the same operation as the above once [further] and for which phenol layers were collected are put together, it dialyzes 1 night, phenol is removed, and it is extra **** equipment (made by Advantec Toyo Kaisha, Ltd.) about the liquid in dialysis. Extra **** concentration was carried out under 2-atmosphere nitrogen gas with the molecular weight 200,000 cut-off film using UK-200.

[0033]The obtained rough LPS freeze-drying thing is dissolved in distilled water, filter sterilization is carried out, buffer solution is added, and it is anion exchange chromatography (Pharmacia manufacture.). It applied to Q-sepharose first flow, the sample solution was dipped in the column with the buffer solution containing NaCl of the 10mM tris-HCl (pH 7.5) and 10mM, and the rim lath activity fraction was eluted by 200 - 400mMNaCl / 10mM tris-HCl (pH 7.5). Extra **** of this eluate was carried out on the same conditions as the above, and it desalted and condensed, and it freeze-dried and about 300-mg refining LPS was obtained from about 70-g wet fungus body.

[0034]Next, although an embodiment is shown and this invention is explained still in detail and concretely, this invention is not limited to the following examples.

[0035]

[Working example]

Refining LPS100mg obtained by the same method as the embodiment 1 reference example 1 by the concentration of 5mg/ml A solubilization buffer solution [3% sodium deoxycholate (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), It consists of 0.2M sodium chloride, 5mMEDTA-2Na, and 20mM tris-chloride, Dissolve in pH 8.3] and 20 ml of refining LPS solutions are calmly stratified in the upper part of a sephacryl S-200HR column (Pharmacia manufacture), It consisted of an elution buffer [0.25% sodium deoxycholate (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0.2M sodium chloride, 5mMEDTA, and 10mM tris-chloride, and 800-ml (50 hours) elution was carried out at the 16ml/o'clock rate of flow by pH 8.3].

[0036]He is a fraction collector (made by ADVANTEC Co., Ltd.) about the eluate obtained while controlling the rate of flow using peristaltic pump PI (Pharmacia manufacture). Fractionation was carried out by SF2120, 240 ml (a part for 24 fractions) of the beginning was discarded, and fractionation was carried out up to 80 fractions in 10 ml / fraction after that. A fixed quantity of sugar was performed with the undiluted solution or the diluent about each eluted fraction by phenol / sulfuric acid method (the volume on Fukui ****, "the assay of reducing sugar and the 2nd edition", the 50-52nd page, Japan Scientific Societies Press, 1990), and the elution state was investigated. From the result of

an acquired elution state, existence of LPS performed SDS-PAGE among the fractionation (fractions 30-60) expected using 0.5 ml of each fraction of the fractions 37-55, and investigated the fractionation pattern of LPS. As a result, since only amount (molecular weight about 30 to 60 kD) LPS of polymers was accepted in the fractions 30-36 and LPS of both a polymer daily dose and low molecular weight was accepted in the fractions 37-44, the amount LPS fractionation of polymers of the fractions 30-36 was further refined as follows.

[0037]Each fraction was mixed, and it freeze-dried, and suspended to ethanol, centrifugal separation removed deoxycholic acid meltable to ethanol, and amount LPS of polymers was collected to the insoluble fraction. Repeat the ethanol treatment of the amount LPS fraction of polymers twice [further], and deoxycholic acid is removed, Next, it suspended again to ethanol 70%, the buffer constituent was removed by centrifugal separation, this operation was repeated further 3 times, amount LPS of polymers was collected to the insoluble fraction, it freeze-dried and refined amount LPS about 47 mg of polymers was obtained.

The punt exhaust air AGUROME lance bacillus was cultivated by L-bouillon culture medium by the same method as the embodiment 2 reference example 1, and about 100 g of wet fungus bodies were obtained. After the physiological saline washed this wet fungus body 50g, and having suspended in 250 ml of chilled water, adding equivalent weight of 0.5N trichloroacetic acid (following TCA) solution cooled at 4 °C and shaking for 3 hours, centrifugality was carried out by 6,000xg at 4 °C for 30 minutes. The same operation extracted precipitate by TCA, each supernatant liquid was put together, and about 450 ml of supernatant liquid was obtained. After adjusting pH of this supernatant liquid to 6.5, it was neglected at -4 °C overnight, agitating 900 ml of ethanol cooled at -10 °C. Then, after melting and dialyzing precipitate in water, centrifugality was carried out for 30 minutes by 27,000xg, supernatant liquid was collected, this was freeze-dried, and it was referred to as rough LPS.

[0038]The obtained rough LPS freeze-drying thing is dissolved in distilled water, filter sterilization is carried out, buffer solution is added, and it is anion exchange chromatography (Pharmacia manufacture.). It applied to Q-sepharose first flow, the sample solution was dipped in the column with the buffer solution containing NaCl of the 10mM tris-HCl (pH 7.5) and 10mM, and the rim lath activity fraction was eluted by 200 - 400mM NaCl / 10mM tris-HCl (pH 7.5). Extra **** of this eluate was carried out on the same conditions as the above, and it desalted and condensed, and it freeze-dried and about 200-mg refining LPS was obtained.

[0039]Hereafter this refining LPS 100mg by the same method as Embodiment 1 by sodium deoxycholate existence-ization. Gel **** is carried out using a sephacryl S-200HR column (Pharmacia manufacture), Measure the sugar content of each fraction and existence of LPS performs SDS-PAGE about the fraction expected, The fractions in which only amount LPS of polymers exists were collected, it suspended to after-freeze-drying ethanol, centrifugal separation removed impurities, such as deoxycholic acid meltable to ethanol, amount LPS of polymers collected by the insoluble fraction was freeze-dried, and amount LPS about 51 mg of refining polymers was obtained.

[0040]

[Effect of the Invention]New high amount LPS of polymers of bioactive is provided very highly [the safety which can be used as drugs etc.] by this invention as explained in detail above.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]Drawing 1 is the SDS-PAGE electropherogram of the amounts LPS and LPS of polymers.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-245702

(43) 公開日 平成8年(1996)9月24日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00			C 0 8 B 37/00	Z
// C 1 2 P 19/04			C 1 2 P 19/04	C

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平7-52964

(22) 出願日 平成7年(1995)3月13日

(71) 出願人 595013106

水野 傳一

神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号

(71) 出願人 390025210

柚 源一郎

東京都世田谷区東玉川1-10-21

(72) 発明者 水野 傳一

神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号

(72) 発明者 柚 源一郎

東京都世田谷区東玉川1丁目10番21号

(72) 発明者 西沢 孝志

東京都北区西ヶ原2丁目35番12号

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 高分子量リボポリサッカライド

(57) 【要約】

【構成】 微生物菌体から得られ、a) タンパク質マーカーを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が 30,000~60,000 であり、分子量 10,000 以下の画分を実質的に含まないこと、b) エルソナーモルガン法により測定したヘキソサミン含量が 3~9 個/分子量 30,000 であること、c) ジフェニルアミン法により測定した 2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が 20~30 個/分子量 30,000 であること、の特定の理化学的性質を有する高分子量リボポリサッカライド。

【効果】 安全性および生物活性が高く、医薬品等として使用し得る新規な高分子量 LPS が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微生物菌体から得られ、次の a) ~ c) の理化学的性質、

a) タンパク質マーカーを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が 30,000 ~ 60,000 であり、分子量 10,000 以下の画分を実質的に含まないこと、

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が 3 ~ 9 個/分子量 30,000 であること、および

c) ジフェニルアミン法により測定した 2-ケート-3-デオキシオクトネート含量が 20 ~ 30 個/分子量 30,000 であること、を有する高分子量リポポリサッカライド。

【請求項 2】 微生物が、グラム陰性微生物である請求項 1 に記載の高分子量リポポリサッカライド。

【請求項 3】 微生物が、パントエア (Pantoea) 属に属する微生物である請求項 1 または請求項 2 に記載の高分子量リポポリサッカライド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、高い生物活性と安全性を示し、かつ特定の理化学的性質を有する新規な高分子量リポポリサッカライドに関するものである。さらに詳しくは、この発明は、例えば免疫機能活性化剤等の薬剤開発に有用な、安全性の著しく改善された高分子量リポポリサッカライドに関するものである。

【0002】

【従来の技術】リポポリサッカライド (lipopolysaccharide。以下 LPS と記載することがある) は、大腸菌、サルモネラ菌、百日咳菌等のグラム陰性細菌細胞壁のペプチドグリカンを含む外膜に存在する脂質および糖からなる複合化合物であり、O 抗原およびエンドトキシンの活性成分として知られている [ジェー・エム・グューセンおよびアル・ハッケンベック (J.M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第 27 巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第 18 ページ、エルセヴィア (Elsevier) 社、1994 年]。LPS の基本構造は、特異な脂質を有するリピド A、それに共有結合した R コアと呼ばれるオリゴ糖、さらに O 特異多糖の 3 成分よりなっている (日経バイオテク編、「日経バイオテクノロジー最新用語辞典」、第 431 ページ、日経マグローヒル社、1985 年)。

【0003】リピド A の基本構造は多くの菌種に共通であり、基本骨格は β -1, 6 結合のグルコサミニル・グルコサミンからなり C-1 位および C-4' 位にそれぞれリン酸を結合している場合が多い。各アミノ基は 3-ヒドロキシ脂肪酸を、水酸基は数種の飽和脂肪酸または

ヒドロキシ脂肪酸を結合し、独特の糖脂質を形成しているが、脂肪酸の種類は菌種によって多少異なっている。少数例であるが基本骨格が全く異なり、2, 3-ジアミノ-2, 3-ジデオキシ-D-グルコースのみからなる例も報告されている (野間惟道編、「医科学大辞典第 49 巻」、第 82 ページ、講談社、1984 年)。

【0004】R コアの構造はサルモネラ属のようにそれに属する大部分の菌種に共通である場合と、大腸菌のように部分的に異なる数種の構造が知られている場合とがある [ジェー・エム・グューセンおよびアル・ハッケンベック (J.M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第 27 巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第 283 ページ、エルセヴィア (Elsevier) 社、1994 年]。一般にヘプトースと 2-ケート-3-デオキシオクトネート

(以下 KDO と記載することがある) が多くの R コアに共通の構成成分であり、KDO を介してリピド A と結合しているが、菌種によっていずれか一方、または双方が欠如している LPS の存在も知られている [ジェー・エム・グューセンおよびアル・ハッケンベック (J.M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第 27 巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第 294 ~ 295 ページ、エルセヴィア (Elsevier) 社、1994 年]。

【0005】O 特異多糖の構造は、構成成分の中で最も多様であり、菌種に特異的であって、いわゆる O 抗原としての活性を示す。一般に数種の単糖からなるオリゴ糖の繰返し構造を特徴とするが、同一単糖からなるもの、または繰返し構造でないものも知られている。O 特異多糖の生合成は R コアのそれとは異なる遺伝子の支配を受けており、接合または形質導入により異なる菌種の O 特異多糖を置換することが可能であり、菌の毒力およびワクチンの研究等に応用されている [ジェー・エム・グューセンおよびアル・ハッケンベック (J.M. Ghuyssen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第 27 巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第 265 ~ 267 ページ、エルセヴィア (Elsevier) 社、1994 年]。

【0006】LPS は極めて多様な薬理作用を有しているが、例えば抗原および LPS を同時に投与した場合、免疫反応が増強されることから、LPS は現在ワクチン効果を高める補助剤 (アジュバント) の一種として応用されている (本間遜也編、「細菌内毒素」、第 312 ページ、講談社、1973 年)。LPS の分子量はその会合状態によって、数百万から数千までと多岐にわたることが報告されているが (本間遜也編、「細菌内毒素」、第 217 ~ 218 ページ、講談社、1973 年)、分子

量が30,000~60,000程度のLPSとしては、分子量30,000±5,000、ヘキソサミン数45±6/分子量30,000、KDO数5±1/分子量30,000の大腸菌由来LPS（特開平4-49245号公報）、分子量40,000±10,000、ヘキソサミン数45±6/分子量30,000、KDO数5±1/分子量30,000の大腸菌由来LPS（特開平6-40937号公報）等がこれまでに報告されている。

【0007】LPSの用途についてはこの発明の発明者等により、これまでに抗トキソプラズマ剤（特開平4-492459号公報）、コレステロール低下剤（特開平4-49243号公報）、抗ヘルペス剤（特開平4-49242号公報）、抗リュウマチ剤（特開平4-49241号公報）、抗糖尿病剤（特開平4-49244号公報）、抗消化性潰瘍剤（特開平4-49240号公報）、免疫機能活性化剤（特開平4-99481号公報、特開平6-141849号公報）、経口・経皮免疫機能促進剤（特開平4-187640号公報）、鎮痛剤（特開平6-40937号公報）、発育促進剤（特開平3-155778号公報）、抗禁断症状剤（特開平6-65092号公報）等が提案されている。

【0008】しかしながら、通常、微生物から得られるLPSは、会合のため化学的に不均一（分子量と化学組成が異なる種々のLPSの混合物）で、その性状を理化学的に規定することは極めて困難であり、また毒性も高く、医薬品としての応用には限界があった（日本組織培養学会編、「細胞成長因子part 1」、第121ページ、朝倉書店、1987年）。

【0009】また、この発明の発明者等は、分子量30,000~60,000程度のLPSの存在を開示しているが（特開平4-99481号公報）、これは分子量5,000~6,000程度のLPSとの混合物であり、低分子量の画分の相当量含有していた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】前記のとおり、従来報告されている高分子量のLPSは、低分子量LPSを含む不均一な混合物であり、例えば免疫機能活性化剤等の薬剤成分として臨的に用いるには、安全性の面からも、あるいは薬効性能の面からも必ずしも満足のできるものではなかった。

【0011】このため、従来技術を改良し、高度に精製された高分子量LPSを分離し、その産業上の有用性を検討することが待望されていた。この発明は、以上のとおり事情に鑑みてなされたものであり、安全性が高く（即ち、毒性が低く）、かつ生物活性が優れ、化学的に特定された新規な高分子量LPSを提供することを目的としている。

【0012】

【課題を解決するための手段】この発明の発明者等は、

前記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、従来報告されているLPSから理化学的に特定される高分子量LPSを精製し、しかもこの新規な高分子量LPSが、従来のLPSに比べて極めて安全性が高く、かつ生物活性も従来のLPSに比して優れていることを見出し、この発明を完成した。

【0013】すなわち、この発明は、微生物菌体から得られ、次のa)~c)の理化学的性質、

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が30,000~60,000であり、分子量10,000以下の画分を実質的に含まないこと、

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が3~9個/分子量30,000であること、および

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が20~30個/分子量30,000であること、を有する高分子量リポポリサッカライドを提供する。

【0014】また、この発明においては、前記の微生物がグラム陰性細菌であること、さらにはそのグラム陰性細菌がパントエア属に属する微生物であることを望ましい態様としてもいる。以下、この発明について詳しく説明する。なお、以下の説明において、百分率の表示は、特に断りのない限り、重量による値である。

【0015】この発明の高分子量LPSは、グラム陰性の微生物、例えば、パントエア属に属する微生物等を、常法により培養し、培地から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法〔オー・ウエストファール(O. Westphal) 編、メソツ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)社、1965年]により抽出し、さらに、陰イオン交換樹脂により精製して製造できる。即ち、微生物の菌体を蒸留水に懸濁し、この懸濁液を蒸留水および等容量の熱フェノールの混合液に添加して攪拌し、次いで遠心分離して水層を回収し、この水層を透析してフェノールを除去し、限外濾過法により濃縮して粗LPS画分を採取し、この画分を常法の陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、モノQ-セファロースまたはQ-セファロースを使用する）により精製し、常法により脱塩する。

【0016】このようにして得られた精製LPSを、例えばデオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下でゲル濾過することにより、高分子量LPSを含有する画分のみを回収し、混在する低分子量LPSを除去し、高度に精製されたこの発明の新規な高分子量LPSを得ることができる。以上の方法により製造されたこの発明の高分子量LPSは、後記する試験例1に示すとおり、

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が30,000~60,000であり、分子量10,000以下の画分を実質的に含まないこと、

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が3~9個/分子量30,000であること、および

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が20~30個/分子量30,000であることという理化学的性質を有している。

【0017】この発明の新規な高分子量LPSは、免疫機能活性化作用を有する医薬品、動物用薬品等として使用することもでき、また、他の公知の免疫機能活性化作用を有する物質と併用することもできる。次に試験例を示し、この発明の高分子量LPSについてさらに詳しく説明する。

試験例1

この試験は、この発明の高分子量LPSの理化学的および生物学的性質を調べるために行った。

1) 試料の調製

実施例1および参考例1と同一の方法により高分子量LPSおよび従来のLPSをそれぞれ調製した。

2) 試験方法

①分子量の測定

高分子量LPSおよび従来のLPS（以下単にLPSと記載する）を各々蒸留水に溶解して2mg/mlの濃度の溶液を調製し、その10μgを1.5ml容プラスチックチューブに秤取した。これとは別に、180μlの10% (w/v) SDS、45μlの5%β-メルカプトエタノール、90μlのCBB色素溶液、112.5μlの0.5Mトリス塩酸 (pH6.8) および22.5μlの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10μlを、前記各試料溶液に添加して十分混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸し、その後直ちに氷水中に浸して急冷した。

【0018】10mlの10% (w/v) SDS、17.9gのトリシンおよび3.03gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をスラブゲル電気泳動槽（マリソル社製）に入れた。20%ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50Vに1時間、次いで、150Vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を継続した。泳動終了後に、銀染色キット161-0443（バイオラッド社製）により室温で銀染色を行い、挙動を確認した。

*

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{630} - A_{650} \dots \dots \dots (1)$$

$$X = (0.5 \times S_1 \times \text{LPS 1モルの分子量}) / (0.5 \times S_2 \times 10^6) \dots \dots \dots (2)$$

④リムラス活性の測定

* ②ヘキソサミン含有量の定量

ヘキソサミン含有量を、エルソン-モルガン(Elson-Morgan)法（日本生化学会編、「生化学実験講座」、第4巻、第377~379ページ、第1版、東京化学同人出版、1976年）により次のとおり定量した。LPSを蒸留水に溶解して2mg/mlの濃度の溶液を調製し、その100μlをスクリュウキャップ付きスピッツ（イワキガラス社製）に秤取し、これに100μlの8NHClを添加して110℃で16時間加熱し、のち4NNaOHを約200μl添加してpHを7に調整した。その100μlを秤取し、別のスクリュウキャップ付きスピッツに入れ、200μlの試薬Aを加え、105℃で1.5時間加熱し、流水で冷却した。次いで、その100μlを分取し、670μlの96%エタノールを加え、さらに67μlの試薬Bを加え、室温で1時間放置し、535nmにおける吸光度を測定した。検量線作成用標準試料としては0~800μg/mlのN-アセチルグルコサミン（和光純薬工業社製）を用いた。

試薬A：75μlのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムとの混合液。

試薬B：1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒド、30mlの濃塩酸および30mlの96%エタノールの混合液。

③KDO含量の定量

KDO含有量をジフェニルアミン法〔アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第58巻、第1号、第123~129ページ、1974年〕により次のとおり定量した。

【0019】500mgのジフェニルアミン（和光純薬社製）、5mlのエタノール（和光純薬社製）、45mlの水酢酸（和光純薬社製）、50mlの濃塩酸（和光純薬社製）を混合してKDO検出試薬を調製した。その500μlに、0.50mg/mlの濃度で各試料を含む250μlの水溶液を混合し、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱し、のち恒温水（24~25℃）中で30分間冷却し、分光光度計（日立製作所製。モデルU2010）により420、470、630、650nmでの吸光度を測定した（測定値を各々A420、A470、A630、A650と記載する）。標準試料として、0.5μモルの濃度のKDOアンモニウム塩（シグマ社製）水溶液250μlを使用した。

【0020】検体試料および標準試料の4種の測定値から、式（1）によりS値を求め、検体試料および標準試料のS値をそれぞれS₁およびS₂とした。次いで式（2）によりKDOのモル数Xを算出した。

50 リムラス活性とは、1968年にレヴィンにより創案さ

れたカプトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステスト（鈴木郁生編、「医薬品の開発第14巻：医薬品の品質管理及び試験法」、第227～243ページ、廣川書店、1990年）で陽性を呈することを意味し、このリムラステストはLPS検出法として知られている。標準品として、345pg/EUのイー・コリ(E. coli) 0111:B4を用いてトキシカラーシステム（生化学工業社製）を使用して測定した。

3) 試験結果

①分子量

分子量測定の結果は、図1に示すとおりである。図1は、SDS-PAGE泳動図であり、図中レーン1は同時に泳動させたタンパク質およびペプチド分子量マーカー[94kD、67kD、43kD、30kD、20.1kD、17.2kD、14.6kD、14.4kD、8.24kD、6.38kD、2.56kD（ファルマシア社製）]、レーン2、3および4はLPS（20μg、5μgおよび1.25μg）、レーン5、6および7は高分子量LPS（20μg、5μgおよび1.25μg）であり、図の縦軸は、分子量を示す。

【0021】高分子量LPSの分子量は図1のように、30kDaから60kDaであった。また、レーン5では20μgの高分子量LPSを泳動させたにもかかわらず、低分子量LPSは全く認められなかった。以上の結果から、この発明の高分子量LPSの分子量は、30,000～60,000であり、低分子量LPSが完全に除去されていることが判明した。②ヘキソサミン含量
この発明の高分子量LPSのヘキソサミン数は6.18/分子量30,000であった。

③KDO含量

この発明の高分子量LPSに含まれるKDOは25.38/分子量30,000であった。

④リムラス活性

この発明の高分子量LPSのリムラス活性は1.45EU/ngであった。

【0022】なお、微生物の種類および試料の製造方法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

試験例2

この試験は、この発明の高分子量LPSの急性毒性を調べるために行った。

(1) 試料の調製および試験方法

実施例1と同一の方法で調製した高分子量LPSおよび参考例1と同一の方法で調製したLPSの毒性を、7週齢のC3H/Heマウス（日本チャールス・リバー社から購入）を用いて試験した。1群4匹からなるマウス群に、各試料を生理食塩水に溶解し、1匹あたり5.0、10または20mg/kgの割合で静脈内に投与した。投与後72時間マウスの生死を観察した。

(2) 試験結果

この試験の結果は表1に示すとおりである。表1から明らかなように、静脈内投与の場合、この発明の高分子量LPSでは20mg/kg投与で4匹中3匹のマウスが死亡し、LD₅₀は18mg/kgであったが、LPSでは10および20mg/kgの投与量で全数が死亡し、LD₅₀は6.0～8.6mg/kgであった。なお、微生物の種類および試料の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0023】

10 【表1】

試料	静脈内投与			
	投与量 (mg/kg)	死亡数	死亡率(%)	LD ₅₀
LPS	5 10 20	0/4 4/4 4/4	0 100 100	7.1 (6.0-8.6)
高分子量 LPS	5 10 20	0/4 0/4 3/4	0 0 75	18 (13-24)

【0024】試験例3

この試験は、この発明の高分子量LPSを皮内投与した場合の毒性を調べるために行った。

(1) 試料の調製および試験方法

試験例2と同一の高分子量LPSおよびLPSを1匹あたり10、20、40または80mg/kgの用量で腹部皮内に投与したことを除き、試験例2と同一の方法により試験した。

(2) 試験結果

30 この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなように、LPSを40および80mg/kg投与した場合、いずれも4匹中4匹が死亡した。これに対して、高分子量LPSにおいては40mg/kgの投与量では死亡例が0であり、80mg/kgの投与量で4匹中3匹が死亡した。

【0025】前試験例2および試験例3の結果から、LD₅₀を算出すると表3のとおりである。表3から明らかなように、高分子量LPSのLD₅₀の値はLPSのそれに比べて、静脈内投与および皮内投与のいずれにおいても約2.5倍であった。これらの結果は、LPSの分子量の相違が毒性に影響を及ぼすことを示しており、高分子量LPSは、従来のLPSに比して静脈内および皮内投与のいずれの場合においても、極めて毒性の低いことが判明した。なお、微生物の種類および試料の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0026】

【表2】

試 料	皮 内 投 与			
	投 与 量 (mg/kg)	死亡数	死 亡 率 (%)	L D 5 0
L P S	1 0	0 / 4	0	2 8 (23-34)
	2 0	0 / 4	0	
	4 0	4 / 4	1 0 0	
	8 0	4 / 4	1 0 0	
高分子量 L P S	1 0	0 / 4	0	7 2 (52-98)
	2 0	0 / 4	0	
	4 0	0 / 4	0	
	8 0	3 / 4	7 5	

* 【0027】

【表3】

10

*

試 料	毒 性 (L D 5 0) (m g / k g)	
	静 脈 内 投 与	皮 内 投 与
L P S	7. 1 (6. 8-8. 6) 7. 0 (2. 5-20)	2 8 (23-34)
高分子量 L P S	1 8 (13-24)	7 2 (52-98)

【0028】試験例4

この発明の高分子量LPSの生物活性を、抗腫瘍作用を有するTNF産生能を指標として調べた。

1) 供試動物および試験方法

各群3匹の7週齢の雄C3H/Heマウス（日本チャールズ・リバー社より購入）を用い、腹部皮内投与によりTNF産生効果を次のとおり試験した。

【0029】実施例1と同様の方法で製造した高分子量LPSまたは参考例1と同じ方法で得られたLPSを1、10または100μg含む生理食塩水0.05mlを各マウスの腹部皮内に注射し、その1.5時間後に採血して常法により血清を分離した。得られた各血清中のTNF活性を、L929細胞に対する毒性に基づく方法により、次のとおり測定した。即ち、L929細胞を5%ウシ胎児血清を含有するMEM培地で 8×10^4 個/100μlの濃度に調製し、これを96穴平底プレートに各穴に100μlづつまき、37℃で2時間、5%CO₂存在下で培養した。その後アクチノマイシンDを1μg/mlの割合で添加し、MEM培地で段階希釈した※

※血清試料または陽性対照ヒトTNF-α（旭化成社製）

を50μlづつ添加し、さらに同一条件で18時間培養した。培地をアスピレーターで除去し、37℃のPBSで洗浄して死細胞を完全に除去し、0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて生細胞を染色した。この染色度をOD（590nm）での吸光度を指標として測定し、陽性対照として用いたTNF-αの希釈率と吸光度との関係をもとにTNF活性を算定した。

2) 試験結果

この結果は、表4に示すとおりである。表4においてTNF活性は各群3匹の平均値である。この結果からこの発明の高分子量LPSのTNF産生効果は、参考例1の方法で得られるLPSと比較して、約2倍であることが認められた。なお、微生物の種類および試料の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0030】

【表4】

試 料	投与量 (μg/匹)	血清中TNF濃度 (単位/ml)	
		皮 内	投 与
L P S	1. 0	4. 0	
	1 0	13. 1	
	1 0 0	25. 5	
高分子量 L P S	1. 0	7. 7	
	1 0	24. 3	
	1 0 0	54. 2	

【0031】参考例1

トリプトン（ディフコ社製）10g、酵母エキス（ディフコ社製）5g、NaCl（和光純薬工業社製。特級）10gを蒸留水1リットルに添加し、NaOHでpHを7.5に調整し、オートクレーブで滅菌し、別に滅菌したグルコース（和光純薬工業社製。特級）を0.1%の

割合で添加した培地（以下L-肉汁培地と記載する）100mlの入った500ml容の坂口フラスコに、-80℃で保存されているパントエア・アグロメランズ（Pantoea agglomerans）保存菌株から単一コロニーを分離して接種し、35℃で1夜振とう培養し、そのまま全量を1,000mlのL-肉汁培地の入った3リットル容の

坂口フラスコに接種し、同様に培養した。

【0032】さらに、7リットルのLー肉汁培地の入った10リットル容の卓上型ファーマンター（丸菱バイオエンジニア社製）に培養した菌体を接種し、同条件で通気培養し、のち集菌し、約70gの湿菌体を回収し、これを凍結保存した。凍結保存菌体約70gを500mlの蒸留水に懸濁し、500mlの90%熱フェノールを添加して65～70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000G、4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層をさらに1回前記と同一の操作を反復し、回収した2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置（アドヴァンテック・トーヨー社製。UK-200）を用いて分子量20万カットオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮した。

【0033】得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製。Q-セファロース・ファースト・フロー）にかけ、10mMトリス-HCl（pH7.5）および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200～400mMNaCl/10mMトリス-HCl（pH7.5）でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約70gの湿菌体から約300mgの精製LPSを得た。

【0034】次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0035】

【実施例】

実施例1

参考例1と同一の方法で得た精製LPS100mgを5mg/mlの濃度で可溶性緩衝液〔3%デオキシコール酸ナトリウム（和光純薬工業社製）、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTA-2Naおよび20mMトリス-塩酸からなり、pH8.3〕に溶解し、精製LPS溶液20mlをセファクリルS-200HRカラム（ファルマシア社製）の上部に静かに重層し、溶出緩衝液

〔0.25%デオキシコール酸ナトリウム（和光純薬工業社製）、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTAおよび10mMトリス-塩酸からなり、pH8.3〕により流速16ml/時で800ml（50時間）溶出した。

【0036】ペリスタポンプP1（ファルマシア社製）を用いて流速を制御しながら、得られた溶出液を、フラクションコレクター（アドバンテック社製。SF2120）により分画し、最初の240ml（24フラクション分）を廃棄し、その後10ml/フラクションで80フラクションまで分画した。溶出した各画分について原

液または希釈液でフェノール/硫酸法（福井作蔵編、

「還元糖の定量法・第2版」、第50～52ページ、学会出版センター、1990年）により糖の定量を行い、溶出状態を調べた。得られた溶出状態の結果から、LPSの存在が予想される分画（フラクション30～60）のうち、フラクション37～55の各フラクション0.5mlを用いてSDS-PAGEを行い、LPSの分画パターンを調べた。その結果、フラクション30～36では高分子量（分子量約30～60kD）LPSのみが認められ、フラクション37～44では高分子分量および低分子量の両方のLPSが認められたので、フラクション30～36の高分子量LPS分画を次のとおりさらに精製した。

【0037】各画分を混合して凍結乾燥し、エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶性デオキシコール酸を除去し、高分子量LPSを不溶性画分に回収した。高分子量LPS画分のエタノール処理をさらに2回反復し、デオキシコール酸を除去し、次に70%エタノールに再度懸濁し、遠心分離で緩衝液成分を除去し、この操作をさらに3回反復し、高分子量LPSを不溶性画分に回収し、凍結乾燥し、精製した高分子量LPS約47mgを得た。

実施例2

参考例1と同様の方法によりLー肉汁培地でパントエア・アグロメランス菌を培養し、湿菌体約100gを得た。この湿菌体50gを生理食塩水で洗浄した後、250mlの冷水に懸濁し、4℃に冷却した等量の0.5Nトリクロル酢酸（以下TCA）水溶液を加えて3時間振とうした後、4℃で6,000×gで30分遠心した。さらに、沈殿を同様の操作にてTCAで抽出し、各上清を合し、約450mlの上清を得た。この上清のpHを6.5に調整した後、-10℃に冷却したエタノール900mlを攪拌しながら加えて、-4℃で一夜放置した。その後、沈殿を水に溶かして透析した後、27,000×gで30分間遠心して上清を回収し、これを凍結乾燥し粗LPSとした。

【0038】得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製。Q-セファロース・ファースト・フロー）にかけ、10mMトリス-HCl（pH7.5）および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200～400mMNaCl/10mMトリス-HCl（pH7.5）でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約200mgの精製LPSを得た。

【0039】以下、実施例1と同様の方法で、この精製LPS100mgをデオキシコール酸ナトリウム存在化で、セファクリルS-200HRカラム（ファルマシア社製）を用いてゲル濾過し、各画分の糖含量を測定し、

LPSの存在が予想される画分についてSDS-PAGEをおこない、高分子量LPSのみが存在する画分を回収し、凍結乾燥後エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシコール酸等の不純物を除去し、不溶性画分に回収された高分子量LPSを凍結乾燥し、精製高分子量LPS約51mgを得た。

【0040】

*【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明により、医薬品等として使用し得る安全性が極めて高く、かつ生物活性の高い新規な高分子量LPSが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、高分子量LPSおよびLPSのSDS-PAGE電気泳動図である。

【図1】

